



RIBOSOME USING PHOSPHATIDE AS BASE AND MEDICINE COMPOSITION**Publication number:** JP62294432**Publication date:** 1987-12-21**Inventor:** BARATSUTO JIRIAN MAAGARETSUTO;
RETSUDORAA EDOGARU; PUCHI
JIYANNFURANSOWA; TOONIYU JIYANNPIERU
JIYORUJIY; YAPO YAO AREKISANDORU**Applicant:** CENTRE NAT RECH SCIENT**Classification:****- International:** A61K38/00; A61K9/127; A61K38/14; A61K38/21;
A61P37/04; B01J13/02; A61K38/00; A61K9/127;
A61K38/14; A61K38/21; A61P37/00; B01J13/02;
(IPC1-7): A61K9/10; A61K37/02; B01J13/02**- European:** A61K9/127; A61K9/127B; A61K38/14; A61K38/21C**Application number:** JP19870084900 19870408**Priority number(s):** FR19860004977 19860408**Also published as:** EP0241376 (A1) FR2596651 (A1)**Report a data error here**

Abstract not available for JP62294432

Abstract of corresponding document: EP0241376

The phosphoinositol mannosides used in the preparation of the liposomes are, in particular, those extracted from mycobacteria. The pharmaceutical compositions include an activator of monocytes and/or macrophages encapsulated in these liposomes.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-294432

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和62年(1987)12月21日
 B 01 J 13/02 Z-8317-4G
 A 61 K 9/10 3 2 7 6742-4C
 37/02 A B D 8615-4C 審査請求 未請求 発明の数 2 (全10頁)

⑮ 発明の名称 リン脂質を基材としたリボソームと医薬組成物

⑯ 特 願 昭62-84900

⑰ 出 願 昭62(1987)4月8日

優先権主張 ⑱ 1986年4月8日 ⑲ フランス(FR) ⑳ 8604977

㉑ 発 明 者 バラット、ジリアン・ フランス国、パリ、リュ・ダルクエイル、20
 マーガレット

㉒ 発 明 者 レッドラー、エドガル フランス国、ソー、ブールバール・コルベ、9

㉓ 出 願 人 サントル・ナシヨナ フランス国、パリ、ケー・アナトル・フランス、15

ル・ド・ラ・ルシエル

シエ・シヤンティファイ

ツク・(セ・エヌ・エ

ール・エス)

㉔ 代 理 人 弁理士 八木田 茂 外2名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

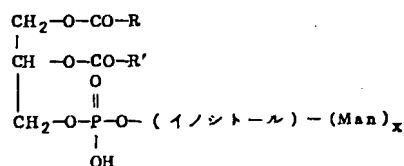
リン脂質を基材としたリボソームと
 医薬組成物

2. 特許請求の範囲

1. リン脂質としてホスファチジルイノシトール・マンノシド類が用いられてあることを特徴とする、リン脂質を基材としたリボソーム。

2. ホスファチジルイノシトール・マンノシド類はミコバクテリウム属微生物の抽出物である特許請求の範囲第1項記載のリボソーム。

3. ホスファチジルイノシトール・マンノシド類は次式



〔式中、R及びR'は夫々に、炭素数11～25の

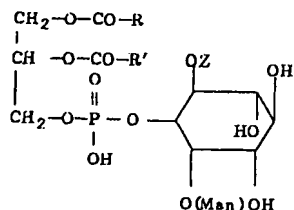
脂肪酸基を示し、この脂肪酸基は場合により2重結合を含有してもよく、(Man)_xはイノシトールに結合した少なくとも1つのマンノシド基を示し、xはマンノース単位の数を示す〕で表わされるものである特許請求の範囲第1項記載のリボソーム。

4. R及びR'は夫々に、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、オレイン酸の如きオクタデセン酸、パルミトレイン酸、ネルボン酸及び10-メチルステアリン酸からなる群から選ばれる酸の残基を示す特許請求の範囲第3項記載のリボソーム。

5. xが1～5の範囲の数である特許請求の範囲第3項記載のリボソーム。

6. ホスファチジルイノシトール・マンノシド類は次式

特開昭62-294432(2)



〔式中、R及びR'は夫々に、炭素数11～25の脂肪酸基を示し、この脂肪酸基は場合により2重結合を含有してもよく、Zは水素原子又は-(Man)_y(但し(Man)は少なくとも1つのマンノシド基である)を示し、yは1～4の範囲の数である〕で表わされるホスファチジルミオイノシトール・マンノシドである特許請求の範囲第1項記載のリボソーム。

7. リン脂質小胞の透過性減少剤も含有する特許請求の範囲第1項記載のリボソーム。

8. リン脂質小胞の透過性減少剤はステロールである特許請求の範囲第7項記載のリボソーム。

9. ステロールはコレステロールである特許請求の範囲第8項記載のリボソーム。

3

ソーム(liposome)と言われ、医薬の担持剤、移行剤として用いることが知られている。最近の研究で主として開発されているリボソームは、リボソームに担持された医薬物質がその作用の対象とするターゲット細胞の近辺でのみ又は該細胞と接触した時のみ医薬を放出できる型のリボソームである。

上記のターゲット細胞に対して十分な特異性を示し且つ生体内で満足すべき安定性をもつリボソームを完成することには、解決すべき困難な技術的問題がある。

腫瘍細胞を阻止する研究分野では、モノサイト(単核白血球)及び(又は)マクロファージ(大食細胞)を活性化する技術が知られている。事実、活性化されたマクロファージは腫瘍細胞殺滅作用を有することが知られている。試験管内試験が示すところによれば、或る種の物質、特にムラミルジペプチド(muramyl dipeptide; MDP)とその誘導体はマクロファージを活性化でき且つマクロファージの抗腫瘍作用を誘起できる。モノサイト及

10. リン脂質小胞の透過性減少剤とリン脂質との重量比が2～10の範囲にある特許請求の範囲第7項記載のリボソーム。

11. 特許請求の範囲第1項記載のリボソーム中にモノサイト(単核白血球)活性化物質又はマクロファージ(大食細胞)活性化物質又はこれら両者を封入してなる免疫賦活剤組成物。

12. モノサイト又はマクロファージ活性化物質はムラミルジペプチド又はこれの誘導体、あるいはガンマーインターフェロンである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

3. 発明の詳細な説明

本発明はリン脂質として特にホスファチジルミオイノシトール・マンノシド類を基材とした新規なリボソームに関する。また、本発明はこの新規リボソームを含有する医薬組成物に関する。

リン脂質(ホスホリピド)が水性媒質中で、水性媒質の微細液滴を封入しているリン脂質の小胞体よりなる小胞(vesicle)を形成できる特性を有することは知られている。このような小胞はリポ

4

ビ(又は)マクロファージの活性化剤としてMDP又はこれの誘導体は特に興味をもたれている。

MDP等の化合物は化学合成で製造できるからである。しかしながら、これらMDP等の化合物は生体中で直接使用できない欠点があり、その理由は、投与後に尿中に極めて早く排泄されるからである。

最近の研究によれば、ホスファチジルコリン(PC)とホスファチジルセリン(PS)を基材としたリボソームに封入してムラミルジペプチド(MDP)を用いてマクロファージを活性化することが提案された。この種のリボソームは、ターゲット細胞がマクロファージである場合に特に興味があると言われる〔主として曾根三郎らの論文: [Recent Adv. in R.E.S. Research] 22巻/87-200頁(1983)及び「J. Immunol.」129巻/3/3～3/7頁(1982); 並びにシュロット等「Biol. Cell.」47巻87～94頁(1983)〕。

本発明者らは、研究の結果、主としてマクロフ

5

6

特開昭62-294432(3)

アージに接近して医薬をマクロファージへ運搬する担持体として作用できる新規なリポソームの創製に成功した。本発明によるリポソームの有利な特性は、このリポソームがマクロファージにより捕捉、取込まれることが前出の研究者で提案されたPC-PS型のリポソームにより妨害されないことである。換言すれば、本発明のリポソームのマクロファージによる捕捉、取込み機構は、PC-PS型リポソームのマクロファージによる捕捉、取込み機構と異なるのであり、これによつて、相互に妨害することなくPC-PS型リポソームと本発明のリポソームとの相異なる2つの型のリポソームの併用が可能になる。

マクロファージをターゲット細胞とすることのできるリポソームについての研究では、ホスファチジルコリン(PC)とアミノマンノシル化したコレステロール誘導体を基材としたリポソームを使用することも提案されている〔ウ(Wu)等の論文:「Proc. Natl. Ac. Sci., USA.」78巻4号2033~2037頁(1981年4月号)参照〕。

7

すなわち、本発明者らによつて、リポソームの製造に基材としてホスファチジルイノシトール・マンノシド類(phosphatidyl-inositol mannosides)を有利に使用できることが知見された。

このようなホスファチジルイノシトール・マンノシド類の代表例には、ミコバクテリウム属の微生物から抽出されたものがある。このような微生物からホスファチジルイノシトール・マンノシドを抽出する技術は知られており、例えばC.E.パローらにより「The Journal of Biological Chemistry」238巻1号69~76頁(1963年1月)に記載された方法で行い得る。これに原料として用い得る微生物の例には、ミコバクテリウム・ツベルクロシス(Mycobacterium tuberculosis)、ミコバクテリウム・ボビス(Mycobacterium bovis)(主としてCalmette及びGuerin細菌)及びミコバクテリウム・フレイ(Mycobacterium phlei)(ATCC 354)、等がある。

ホスファチジルイノシトール・マンノシドの化学構造は特に前記の文献に記載される如くC.E.

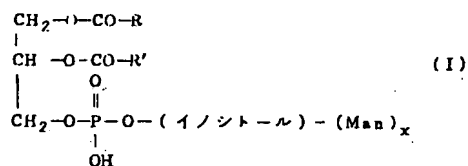
ウ等の研究によれば、前記のアミノマンノシル化した物質を基材としたリポソームは、ホスファチジルコリン-コレステロール型のリポソームによつて妨害される。また、ウ等の研究によれば、ホスファチジルコリン-コレステロールを基材としたリポソーム、あるいはホスファチジルコリン-マンノシル化コレステロールを基材としたリポソームがマイスの腹腔マクロファージにより捕捉、取込まれるのは、前記のアミノマンノシル化誘導体を基材としたリポソームの場合と違つて、微弱である。

本発明者が今回予想外にも、発見したところによれば、或る特定のマンノシル化されたリン脂質をリポソーム基材として用いると、リポソームのマクロファージによる捕捉、取込み率が十分に高いリポソームを創製することができ、しかも、そのリポソーム取込み率は、従来既知のホスファチジルコリン-ホスファチジルセリン型(PC-PS型)リポソームが共存する場合にも低減しないのである。

8

Ballou等の研究から知られており:またT. Kubica及びL.G. Wayne編の文献「The Mycobacteria」原典、A部(1984)、特に16章、379~415頁をも参照されたい。

本発明は特にリポソームを製造するに際して次式(I):



(式中R及びR'は各々個々に1~25個の炭素原子を有する脂肪族基を表わし、これらの基は場合により二重結合を含有しており、(Man)_xはイノシトールに結合した少なくとも1個のマンノシド基を表わし、xはマンノース単位の数である)のホスファチジルイノシトール・マンノシドの使用に関する。

R及びR'が酸残基である代表的な脂肪酸には主

9

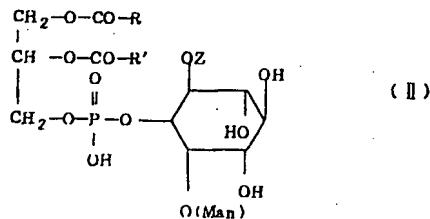
10

特開昭62-294432(4)

としてミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、オレイン酸又は別のオクタデセン酸、パルミトレイン酸、ネルボン酸及びノ-メチルステアリン酸がある。

前記の式(I)においてxは1~5の整数であるのが好ましい。

前記式(I)の代表的なホスファチジルイノシトール・マンノシドには特に次式(II)：



(式中ZはH(元素還元基)又は-(Man)_yを表わし、(Man)は前述の如くであり、yは1~4の整数であり、R及びR'は前述の如くである)のホスホイノシトール誘導体がある。

本発明はまた前述した如きホスファチジルイノ

シトール・マンノシドを用いて製造したリボソームに関する。これらのリボソームは既知のリボソーム製造法により製造でき、例えばL.D.Leserman及びJ.Barbet著の"Methodologie Des liposomes" Seminaire technologique INSERM.. INSERM版を参照されたい。

本発明により用いたホスファチジルイノシトール・マンノシドは合成により製造でき、例えば工業製品であるイノシトールホスフェートを原料として用い、これを既知の方法によりジアシルグリセロールと反応させ次いでマンノシル化することにより製造できる。

本発明のリボソームはホスファチジルイノシトール・マンノシドに加えて、別のリン脂質例えばホスファチジルコリン又はホスファチジルセリン並びにリン脂質小胞の透過性を減少させる薬剤を含有できる。この薬剤は主としてステロール例えばコレステロールである。

ホスファチジルイノシトール・マンノシドと透過性減少剤との重量比は例えば2~10の範囲

にある。

本発明はまた本発明のリボソームに封入したモノサイト及び/又はマクロファージ賦活化成分を含有してなる製薬組成物に関する。

前記の賦活化成分はマクロファージの抗腫瘍活性を増大させ得る薬剤である。

本発明の特定の実施形式では、製薬組成物は前記のモノサイト及び/又はマクロファージ活性剤としてムラミルジペプチド(MDP)又はその誘導体の一種を含有してなる。

MDPは化合物、N-アセチルムラミル-L-Ala-D-イソ-Glyであることは知られている。

MDPの代表的な誘導体には次の化合物がある：ムラミルトリペプチド例えばN-アセチルムラミル-L-Ala-D-イソ-Gly-メソ-A₂pm；ムラミルテトラペプチド例えばN-アセチルムラミル-L-Ala-D-イソ-Gly-メソ-A₂pm-D-Ala；及びムラミルペンタペプチド例えばN-アセチルムラミル-L-Ala-D-イソ-

Gly-メソ-A₂pm-D-Ala-D-Ala。

前記のMDP誘導体としてMDP Chol(MDP-L-アラニル-コレステロール)も用い得る：例えばN.C. Phillip等の"J. Biol. Resp. Mod." 4巻、464~474頁(1985)を参照されたい。

更には本発明の製薬組成物はガンマーインターフェロンの如き免疫活性剤を含有できる。

本発明の免疫活性組成物は例えば静脈内投与又は気管内投与により又は鼻孔内投与用のエロゾルの形でさえ投与できる。

本発明の医薬組成物の薬量は用いた活性薬剤の関数であり、前記活性薬剤の薬量に一般に等しいか又はそれより低くさえある。

本発明の医薬組成物は感染(バクテリアウイルス又は寄生による)に対する生体防御で免疫低下の処置に且つまたガンの処置に特に肺ガン転移を含めてガン転移を防止又は解消するのに主として用い得る。

本発明はまたガンの転移特に肺ガンの転移を防

特開昭62-294432(5)

止し及び／又は転移の根絶に有利となるように前述した如きリボソームの使用に関する。

本発明を次の実施例により説明するが、これに限定されるものではない。

実施例 1

リボソームの製造

キヤメット バチルス (Cametto bacillus) 及びグエリン (Guérin) バチルスのマンノシル化したリン脂質 (PLM と略称) を Ballou 等の J. Biol. Chem. 235 巻、69~76 頁 (1963) に記載された方法により抽出した。この PLM を 2 : 1 の重量比でコレステロール (Prelabo 社) と混合した。

該混合物をクロロホルムに溶解させ、丸底フラスコ中で蒸発乾燥させた。リン脂質緩衝剤を PLM 20 mg 当り / ml の量で添加した。

次いでフラスコ中の混合物を激しく攪拌して渦流を生じさせ且つフラスコの壁面から脂質膜を脱離してリボソームを形成する。

次いでリボソームを 4℃ で 2.5 分間 29,000×

15

封入 (encapsulation) の量

50 mg の PLM を 10 ml のクロロホルム中で 2.5 mg のコレステロール及び 0.5 μ Cl の 14 C-DPPC と混合した。

前記したごとく、蒸発により被膜を形成させついで 150 μ Cl のトリチウム標識蔗糖を含有する PBS 緩衝液 5 ml を添加した。前記したごとく、数回、遠心分離を行った後、沈積物を 1 ml の PBS に再懸濁させついでミリポア (Millipore) 膜上で経過した。

封入の量はリン脂質 / mg 当りの水性相のマイクロリットルで表わした。

遠心分離工程後、封入量は 7.7 であることが認められた。

ミリポアフィルター上での経過工程後、封入量は 9.5 であることが認められた。

PLM : コレステロールリボソームの安定性

予備実験において、前述した方法と同様の方法に従つて、コレステロールを含有していない PLM リボソームとコレステロールを含有する PLM リ

ボソームを 4 回遠心分離して封入されていない水性相を除去した。

各々の遠心分離後に、得られる沈積物を適当な容量のリン脂質緩衝剤に再懸濁させた。

次いでリボソームをセルロース アセテート フィルター (Millipore) 上で経過して 3 μ m より大きい直径のリボソームを除去した。

標識リボソームの製造

種々の測定値時にリボソームへの薬剤封入量を決定し得るために同様な要領で脂質相及び／又は水性相中に放射性剤で標識したリボソームを製造した。

脂質相を標識 (マーク) するには PLM に対してコン跡量の 14 C-DPPC (ジパルミトイル - (14 C) ホスファチジルコリン : New England Nuclear 社 : 0.0 / mCi / mmole) をクロロホルム溶液中で添加した。

水性相を標識するには、コン跡量の (3 H)- ショ糖 (Amersham International 社 : 9.8 Ci / mmole) を添加した。

16

ボソーム (PLM : コレステロールの重量比 2 : 1) を調製した。

水性相の漏洩 (leakage) は牛胎児血清を 5% 含有する媒体中で 37℃ で 30 分間培養 (incubate) した後の放射能 (トリチウム標識蔗糖) の漏洩により測定した。PLM リボソームについての漏洩率は全水性相の 67% であり、これに対し、PLM : コレステロールリボソームについての漏洩率は僅か 6% であつた。

実施例 2

マクロファージによるリボソームの取込み量の測定

(a) マウス炎症マクロファージの製造

チオグリコレートを含有する媒体 1.5 ml を注入することにより、マウスにおける炎症性渗出 (inflammatory exudate) を誘発させた。4 日後、腹腔渗出細胞を捕集し、腹腔内を MEM 媒体 (Institute Pasteur-France) で洗浄した。渗出物と洗液とを一緒にし、細胞を分離させついで、200 × g、4℃ で 10 分間遠心分離することに

17

18

特開昭62-294432(6)

より捕集した。細胞を、抗生物質及び牛胎児血清を不活性化補助剤と共に含有するMEM媒体に懸濁させた。懸濁液は1 ml中に 2×10^6 個のマクロファージが含有されるように調節した。マクロファージの数はニュートラルレッドの添加(incorporation)により評価した。2 mlの懸濁液を直径35 mmのペトリ皿に注入し、そしてこの懸濁液を5%のCO₂を含有する湿った雰囲気下、37℃で3時間培養してマクロファージを付着させた。付着しない細胞はリン酸塩緩衝液で3回洗浄することにより除去した。

(b) ラット肺マクロファージの製造

麻酔をかけたかつ腹大動脈から出血させたラットから肺を摘出し、このラットを気管を介して5 mlの0.9% (重量/容量) 塩化ナトリウム水溶液で6回洗浄した。洗浄液を $200 \times g$ 、4℃で15分間遠心分離した。洗浄液を一掃にし、5%の牛胎児血清と抗生物質を含有するMEM媒体の存在下で遠心分離した。遠心分離沈積物を上記と同一のMEM媒体に再懸濁させ、濃度を 10^6 マ

クロファージ/mlに調整した。前記したごとく、懸濁液をペトリ皿中に注入して細胞を付着させた。付着しない細胞は洗浄により除去した。

(c) マクロファージによるリポソームの取込み(capture)の測定

リポソームを5%の牛胎児血清及び抗生物質を含有するMEM媒体に懸濁させた。

リポソーム濃度を $50 \mu g/ml \sim 400 \mu g/ml$ のリン脂質含有量に調整した。

リポソームを含有する媒体2 mlを前記で得たマクロファージ製剤に添加し、5%のCO₂を含有する湿った雰囲気下、37℃で培養した。培養時間が経過した後、液体媒体を除去し、マクロファージを磷酸塩緩衝液で4回洗浄した。

1% (v/v) のトリトン(Triton)-X-100を含有する磷酸塩緩衝液0.6 mlを添加し、マクロファージをゴムスクレーパーを用いて回収した。トリトン-X-100を含有する緩衝液0.6 mlを用いてこの操作を再度行つた。得られた2つの溶解物(lysate)を一掃にした。

19

結 果

(a) マウス炎症マクロファージについて:

培養時間の影響

マクロファージ(4×10^6 /皿)を $50 \mu g/ml$ のPLM:コレステロールリポソーム(重量比2:1)を含有する媒体2 mlと共に培養した。このリポソームは 500 nm の平均直径を有していた。得られた結果を第I表に示す。

第 I 表

培養時間 (時間)	取込まれた脂質の量 (マイクログラム)
2	2.0
4	3.6
6	6.1
20	18.8

(b) マウス炎症マクロファージによるリポソームの取込み

濃度の影響

20

PC/PSリポソーム(ホスファチジルコリン:ホスファチジルセリン)を慣用の方法で7:3のモル比で調製した。この比率は前記で引用した文献中でSchroitt等により推奨されている。

このリポソームをPLM:コレステロールリポソームと比較した。

マクロファージを2 mlのリポソーム懸濁液と共に培地中で培養した。

各々のリポソーム製剤は¹⁴C-ジパルミトイルホスファチジルコリンで標識を付した。

その後、リポソームは 500 nm の平均直径を有していた。

ペトリ皿1個当り、細胞数 4×10^6 個の量のマクロファージを種々の濃度のリポソームと共に2時間培養した。

得られた結果を第II表に示す。

21

22

特開昭62-294432(7)

第 II 表

リポソーム濃度 (リン脂質の $\mu\text{g}/\text{ml}$)	取込まれたリン脂質の量 (μg) リポソーム PLM	リポソーム PC/PS
50	3.7	1.8
100	6.7	2.7
200	8.9	3.9
400	18.5	6.8

(c) ラット肺胞マクロファージによるリポソームの取込み量

500 nm の平均直径を有するかつ ^{14}C -ジパルミトイルホスファチジルコリンで標識したリポソームの取込み量を 2: PLM: コレステロールリポソームについて測定し、PC: PS リポソームのそれと比較した。

得られた結果を第 III 表に示す。

23

め伊過したものであり、それらの平均直径は 500 nm である。標識付きリポソームをリン脂質 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の量で単独で(すなわち対照試験)又はリン脂質 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の量で存在する前記無標識の製剤のいずれか一方とともに培地中のマクロファージに添加する。

2 時間後、これらの細胞を洗滌しそして標識付きリン脂質の取込み量を測定する。

抑制率(%)はつきのごとく定義される。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

ただし、

A = 無標識リポソームの存在における取込み量

B = 対照試験における取込み量

である。

結果を第 IV 表に示す。

25

第 III 表

リン脂質の $\mu\text{g}/\text{ml}$	16 時間後 2×10^6 個のマクロファージ により取込まれた脂質の μg .
	PLM: コレステロール PC: PS
	リポソーム リポソーム
50	3.9 1.6
100	15.3 8.1

(d) 抑制試験

標識付き PLM: コレステロールリポソームのエンドサイトーシス(細胞内取込み)の間に過剰量の無標識の同一リポソームを添加するとマクロファージによる標識付きリポソームの取込みが抑制される。

たとえば、マウスの炎症細胞マクロファージを各ペトリ皿当たり 4×10^6 個の割合で使用しかつ前記と同様に ^{14}C で標識付けした 2: PLM: コレステロールリポソームと無標識の同一リポソーム及び PC: PS リポソーム(モル比 7: 2)とを使用する。これらのリポソームのすべては予

24

第 IV 表

無標識リポソームの種類	標識付きリン脂質 の取込み量 μg	抑制率 %
なし(対照試験)	3.8	—
PLM: コレステロール	1.0	74
PC: PS	3.8	0

上記試験結果から PC: PS リポソームは PLM: コレステロールリポソームの取込みに対して何等抑制効果をもたないことが認められる。したがってこれら二つの型のリポソームは異なる機構に従って取込まれるものと考えられる。

実施例 3

ラットの肺胞炎(alveolar)マクロファージの試験管内活性化試験

本試験においては MDP の好脂性誘導体、すなわち MDP-L-アラニル-コレステロール誘導体(以下 MTPChol と略称する)を使用する。この物質の活性は他の系においてすでに立証されている(N.C. Phillips ら、J. Biol. Resp. Mod. .

26

特開昭62-294432(8)

4.464-474(1985)参照)。

ホスファチジルイノシトール マンノシド (PLM) 及びコレステロールを2:1のモル比で含有するリポソームを調製しそしてMTPCholをリン脂質120 μ g 当り/ μ molの濃度で配合する。比較のため、MTPCholを含まない同様のリポソームを調製する。

これらのリポソームは滅菌条件下で調製しかつ平均直径440 nmを与えるように処理したものである。

ラットの肺炎マクロファージを1 μ l 当り 8×10^5 個、 4×10^5 個又は 2×10^5 個のマクロファージを含む懸濁液として96個のウェルをもつ皿のキャップ (cupules) 中にウェル当り0.25 μ l の量で接種する。粘着した後、MEM単独又はMTPCholを含まない・空の (empty) ・PLM:コレステロールリポソームを含むMEM又はMTPCholを配合したPLM:コレステロールリポソームを含むMEMのいずれかである培地0.25 μ l を添加する。これらの混合物を37℃で一晩培養

27

他方、MTPCholを含むリポソームは上記したすべての濃度においてマクロファージを活性化し、したがって腫瘍細胞の成長を顕著に抑制し得る。第V表にMTPCholを含む(0.17 μ g/ml) 又は含まないリポソーム1 μ l 当り20 μ g のリン脂質20 μ g を用いて得られた結果を示す。

第 V 表

マクロファージの予備処理	下記の作用因子/標的細胞比でマクロファージを含む標的細胞の成長 (腫瘍のみの%)		
	2	4	8
・空の・リポソーム	74	68	72
リポソーム-MTPChol	47	13	10

実施例4

肺炎マクロファージの生体内活性化試験

実施例3におけるごとく調製したリポソームをMTPCholを配合し又は配合することなく使用する。ラットに0.08 μ g/kgのMTPCholを含む又

し、洗滌しそして同遺伝子型 (syngenic) 標的細胞 [フィブロヒストサイトーム (Fibrohistiocyte) P77] を 10^5 個/mlの量で (作用因子 (エフェクター) / 標的細胞比が8,4及び2となるように)、重水素 (トリチウム) で標識されたチミジン (^3H -TdR) の溶液 (チミジンの最終濃度1.2 μ Mで) とともに添加する。これらの混合物を再度37℃で20時間培養する。腫瘍細胞のDNAを採取しそして標識された前駆物質 (プリーカー) の取込量を液体シンチレーションをもつ分光計を用いて測定する。

結 果

マクロファージの活性化は単独で培養された腫瘍細胞と比較してマクロファージの存在下で培養された腫瘍細胞の成長抑制 (^3H -TdRの取込量の減少) が認められることから明らかである。培地単独で処理されたマクロファージは活性化されない。また・空の・リポソーム、リン脂質20 μ g/ml ~ 400 μ g/ml、で予備培養されたマクロファージも標的細胞の成長の認め得る抑制を示さない。

28

は含まないPLM:コレステロールリポソームの形のPLM/0 μ g/kgを静脈内注射する。

24時間後、これらのラットを殺しそして肺炎マクロファージを採取する。これらのマクロファージは前述したとき同遺伝子型標的細胞に対する静細胞作用 (cytostatic power) について予め試験されたものである。

結 果

これらの結果を成長抑制率 (G.I. %) として下記のごとく表わす。

$$\text{G.I. \%} = (1 - X/R) \times 100$$

ただし、

Xは該リポソームで処理されたラットから採取したマクロファージの存在下で培養された標的細胞による ^3H -TdRの取込み量であり、

Rは対照試験のラットからのマクロファージの存在下で培養された標的細胞による ^3H -TdRの取込み量である。

これらの結果から、・空の・リポソームは若干のマクロファージを活性化し得るが、該リポソ-

29

30

特開昭62-294432(9)

ム中に MTPChol を配合すると顕著な活性化が生ずることが認められる (第 VI 表参照)。

第 VI 表

ラットの処理	下記の作用因子/標的細胞比におけるマクロファージの存在下での G.I. %	
	4	8
"空" リポソーム	3	19
リポソーム-MTPChol	43	48

実施例 5

M D P 誘導体含有リポソームによる処理が生体内における肺胞転移の形成に及ぼす効果

ラットに同遺伝子型腫瘍細胞 (フィブロサチオサイトーム P77 細胞) をラット当り細胞数 5×10^5 個の量で静脈内注射した。一群のラットは P B S 緩衝溶液 0.3 ml 中に MTPChol を含むリポソームで、6 mg/kg のリン脂質用量、すなわち 0.05 mg/kg の MTPChol 用量で静脈内注射に

31

これらの結果は "空" のリポソームは腫瘍の拡張に対して効果を示さないが、MTPChol を含むリポソームは肉眼で認め得る転移細胞数を 50% 減少せしめたことを示している。

より処理した。これらの注射は腫瘍細胞を注射した日を 0 として、1 日目、3 日目、7 日目、10 日目及び 14 日目に行なつた。

第二群のラットには "空" のリポソーム (すなわち MTPChol を配合しない) を注射し、第三群のラットは非処理のまゝとした。腫瘍細胞移植 18 日後に各群のラットを殺しそして肉眼で観察できる肺胞転移細胞数 (the number of pulmonary metastases) を数えた。

結果を第 VII 表に示す。

第 VII 表

処 理	転移細胞数 (平均値 ± 標準偏差)
非処理	96 ± 18
"空" のリポソーム	90 ± 5
リポソーム-MTPChol*	48 ± 12
*ステューデント T 試験後	p < 0.001

32

特開昭62-294432(10)

第1頁の続き

- ⑫発明者 プチ, ジヤソーフラン ソワ フランス国, バリ, リュ・エルネ・ルナン, 24
- ⑬発明者 トーニユ, ジヤソーピ エール・ジヨルジュ フランス国, ムードソーラーフォレ, スクエアー・デ・コロネ, 3
- ⑭発明者 ヤボ, ヤオ・アレキサ ンドル フランス国, カカン, サンチエ・デ・サブロン, 42